

- 1 -

BESCHREIBUNGVerfahren zum Darstellen von biologisch aktivierten induktivitätsändernden Partikeln sowie Vorrichtung dafür

Die Erfindung betrifft ein Verfahren für die Darstellung von biologisch aktivierten induktivitätsändernden -- insbesondere ferromagnetischen bzw. superparamagnetischen -- Partikeln. Zudem betrifft die Erfindung eine Vorrichtung zum Nachweis und Zählen von suspendierten biologischen Mikropartikeln in flüssigen Proben, insbesondere zum Durchführen des genannten Verfahrens.

Das Zählen von Bakterien, Blutzellen oder Zellbestandteilen in wässrigen Lösungen erfolgt bisher mittels Durchflusszytometer oder Coultercounter. Hier werden die entsprechenden Partikel gefärbt und anhand von optischen Signalen identifiziert oder durch kapazitive Messungen gezählt.

In Kenntnis dieser Gegebenheiten hat sich der Erfinder das Ziel gesetzt, derartige Messungen zu vereinfachen.

Zur Lösung dieser Aufgabe führt die Lehre des unabhängigen Anspruches; die Unteransprüche geben günstige Weiterbildungen an. Zudem fallen in den Rahmen der Erfindung alle Kombinationen aus zumindest zwei der in der Beschreibung, der Zeichnung und/oder den Ansprüchen offenbarten Merkmalen.

Erfindungsgemäß werden monovalente primäre Antikörper mit induktivitätsändernden, vor allem ferromagnetischen bzw. superparamagnetischen, Partikeln in mehrfachem Überschuss gemischt, welche mit sekundären Antikörpern beschichtet sind; anschließend werden mittels partieller Sedimentation in einer Zentrifuge aggregierte Partikel abgetrennt, die aus einem monovalenten primären Antikörper und antikörper-

beschichteten ferromagnetischen Teilpartikeln bestehen. Anstelle primärer Antikörper können auch Viren oder Gensonden verwendet werden, gegen deren Hüllproteine bzw. Spacer-moleküle die sekundären Antikörper gerichtet sind.

5

Nach einem weiteren Merkmal der Erfindung können die biologischen Partikel zum Nachweis bzw. zum Zählen immunologisch, phagologisch oder molekularbiologisch mit aggregierten Partikeln verbunden werden, die beim anschließenden
10 Durchströmen einer Metallspule -- insbesondere des Spaltes einer C-förmigen Metallspule mit ferromagnetischem Kern -- messbare und zählbare Induktivitätsänderungen auslösen.

Auch hat es sich als günstig erwiesen, induktivitätsändernde Partikel vor dem Durchströmen der Metallspule
15 mittels Elektromagnet in einer Kunststoffkapillare festzuhalten und dort mit den in die Kapillare einströmenden biologischen Partikeln zu verbinden, während die Probe, in welcher diese enthalten waren, aus der Kapillare herausge-
20 führt wird. Zudem sollen durch die Metallspule als Teil eines elektronischen Schwingkreises zählbare Änderungen der Eigenschwingfrequenz erzeugt werden.

Um den apparativen Aufwand bei der optischen Messung zu um-
25 gehen und eine höhere Spezifität gegenüber der kapazitiven Messung zu erreichen, wird also für den Nachweis des einzelnen Partikels ein geändertes Messprinzip eingesetzt: Die Messung der Induktivitätsänderung einer Mikrospule aus Metall. Da biologische Partikel aber eine Permeabilitätskonstante μ von annähernd 1 haben, müssen diese zum Nachweis
30 und zur Zählung mittels Spule zuvor mit induktivitätsändernden Substanzen markiert werden. Diese Markierung geschieht durch die immunologische, phagologische oder molekularbiologische Ankopplung von ferromagnetischen bzw.
35 superparamagnetischen Partikeln, welche monovalent entweder mit Antikörpern, mit Virus-Andockmolekülen oder mit Gensonden an Spacermolekülen verbunden sind.

Im Rahmen der Erfindung liegt eine Vorrichtung der eingangs genannten Art mit einer Förderleitung für eine zu messende Probe, die als Messleitung von einer Metallspule als Messspule umgeben ist, welche ihrerseits an eine Einrichtung zum Anregen der Schwingung und Messen von Resonanzereignissen angeschlossen ist.

In einer besonderen Ausgestaltung ist diese Metallspule um einen etwa C-förmig gebogenen Kern gelegt, dessen Enden einen Spalt begrenzen; durch diesen Spalt ist die Messleitung gelegt.

Nach einem weiteren Merkmal der Erfindung ist die Förderleitung an eine Einrichtung mit Kapillaren -- insbesondere mit Teflonkapillaren -- angeschlossen; letztere sind einem Elektromagneten zugeordnet und können in einem von einem Polschuh umgebenen Raum angeordnet sein.

Vorteilhafterweise ist zwischen den Elektromagneten und einem Ventil der Förderleitung eine Zweigleitung für überschüssige Proben vorgesehen. Zudem können jener Einrichtung zum Anregen der Schwingung und Messen von Resonanzereignissen zur Metallspule hin wenigstens ein Widerstand sowie ein Kondensator vorgeordnet sein.

Die Messspule, eine ihr vorgeordnete Piezopumpe und ein nachgeordneter Widerstand bzw. Kondensator sollen erfindungsgemäß Teile einer mikrosystemtechnischen Einheit sein.

Die Ankopplung der ferromagnetischen Marker geschieht also in der Vorrichtung, welche gleichzeitig eine Anreicherung der zu zählenden Partikel ermöglicht: Die Marker werden in jener Teflonkapillare mittels eines Elektromagneten als Sorptions-Schicht festgehalten, bis die gesamte Probe in die Kapillare gepumpt wurde und gleichzeitig die überschüssige Probe aus der Kapillare herausgelaufen ist. Hierauf wird der Magnet ausgeschaltet, damit die Marker frei diffundieren und die Oberfläche der biologischen Partikel

sättigen können. Dann wird der Kapillaren-Inhalt mit der erwähnten piezoelektrischen Pumpe durch die Metallspule gepumpt, insbesondere durch den Spalt der C-förmig gestalteten Metallspule mit ferromagnetischem Kern. Die Metallspule wurde als Spirale auf eine Leiterplatte geätzt und ist mit Kondensator und Widerstand als Schwingkreis geschaltet. Der Schwingkreis wird mit einer Frequenz ange-
regt, die derjenigen Eigenschwingfrequenz entspricht, welche generiert wird, wenn sich ein durchschnittlich markierter biologischer Mikropartikel in der Spule bzw. im Spalt befindet. Dadurch entsteht im Schwingkreis immer dann eine Resonanzschwingung, wenn ein entsprechender Mikropartikel durch die Spule tritt.

Ein Beispiel für die Anwendung dieses Verfahrens ist der Nachweis von Kolibakterien in Wasserproben. Hierzu werden monovalente primäre E.-coli-spezifische Antikörper mit an magnetische Beads gekoppelten sekundären Antikörpern konjugiert. Die Suspension dieser Konjugate wird in die Teflon-Kapillare gepumpt und mittels Elektromagnet dort fixiert. Beim Durchströmen der Kapillare mit der zu untersuchenden Wasserprobe werden Kolibakterien über die primären Antikörper an den Konjugaten festgehalten. Nach dem Abschalten des Magneten kann die Suspension von magnetisch markierten Kolibakterien durch die Messspule bzw. den Spalt der Metallspule gepumpt werden. Die Anzahl der Resonanz-Ereignisse im angeschlossenen Schwingkreis entspricht der Anzahl der Kolibakterien in der ursprünglichen Wasserprobe. Durch den Einsatz dieses Gerätes und der entsprechenden Konjugate ist es möglich, ohne den aufwendigen Einsatz der Durchflusszytometrie Bakterien automatisch zu zählen. Des weiteren ist es möglich, mit dieser Messmethode eine Miniatursierung des Nachweisgerätes zu erreichen.

Mit der beschriebenen Technik werden Partikel wie Bakterien, Zellen oder Zellbestandteile in wässrigen Lösungen nachgewiesen und gezählt. Diese Technik ermöglicht eine Miniaturisierung des automatischen Partikelzählverfahrens.

5 Dazu werden die Partikel vor der Messung durch die Reaktion mit monovalenten antikörper- bzw. virenbeschichteten ferromagnetischen Partikeln markiert. Die induktive Messung beruht auf dem Passieren der mit den biologischen Partikeln aggregierten ferromagnetischen Partikel durch die in beschriebener Weise gestaltete Mikrospule eines elektronischen Schwingkreises. Die beim Passieren auftretenden Resonanzereignisse werden gezählt.

15 Die erfindungsgemäße Vorrichtung kann in der Medizin, Mikrobiologie und Hygiene eingesetzt werden, beispielsweise zum Auszählen von Blutzellen; es können ökologisch relevante Mikroorganismen ausgezählt oder krankheitserregende Keime nachgewiesen werden.

Weitere Vorteile, Merkmale und Einzelheiten der Erfindung ergeben sich aus der nachfolgenden Beschreibung eines bevorzugten Ausführungsbeispiels sowie anhand der Zeichnung; diese zeigt in

5

Fig. 1, 3: jeweils ein Schema zu einem erfindungsgemäßen Verfahren;

10

Fig. 2: ein Detail der Fig. 1, 3 in schematisierter Schrägsicht.

15

Vor einem Verfahren zum Nachweis von Kolibakterien in einer durch eine Leitung 10 zugeführten Wasserprobe Z werden monovalente primäre E.-coli-spezifische Antikörper mit an magnetische Beads gekoppelten sekundären Antikörpern konjugiert. Die Leitung für die monovalenten magnetischen Partikel F ist mit 12 bezeichnet. Beide Leitungen 10, 12 enthalten Schlauchpumpen 14 und vereinigen sich nach diesen zu einer gemeinsamen Förderleitung 16.

20

25

Das Reagenz mit ferromagnetischen, biologisch aktivierten Partikeln wird über die Leitungen 12 und 16 in eine Teflonkapillare 20 gepumpt und dort mittels eines Elektromagneten 22 fixiert, dessen Magnetspule mit 24 bezeichnet und dem die Z-förmig aufgewickelte Teflonkapillare 20 in einem konzentrischen Polschuh 26 zugeordnet ist. Dieser begrenzt mit einem von ihm in Radialabstand umgebenen Polstift 28 einen Ringraum 30 für die Teflonkapillare.

30

35

Beim Durchströmen der Kapillare 20 mit der zu untersuchenden Wasserprobe Z werden Kolibakterien als zu zählende biologische Partikel über die primären Antikörper an den ferromagnetischen Konjugaten festgehalten. Nach dem Abschalten des Elektromagneten 22 kann die Suspension von magnetisch markierten Kolibakterien dank einer Piezopumpe 32 in einer Messleitung 34 durch eine geätzte Metallspule als Messspule 36 einer mikrosystemtechnischen Einheit 40 transportiert

werden. Aus dieser werden die gezählten Partikel in Pfeilrichtung X ausgetragen.

Im Ausführungsbeispiel der Fig. 3 wird jene Suspension in der Messleitung 35 durch den Spalt 52 eines ferromagnetischen, C-förmig gebogenen Kerns 50 einer Messspule 36_a transportiert.

Die freien Enden 38, 38_a der Messspule 36, 36_a sind -- nach einem Widerstand 42 und einem Kondensator 44 -- an eine Einrichtung 46 zum Anregen der Schwingung und zum Messen von Resonanzereignissen angeschlossen; dort erfolgt eine Umwandlung in Zählimpulse.

Die Anzahl der Resonanzereignisse im angeschlossenen Schwingkreis entspricht der Anzahl der Kolibakterien in der ursprünglichen Wasserprobe Z.

Zwischen der Teflonkapillare 20 und der Piezopumpe 32 ist ein -- ein Ventil 48 enthaltender -- Leitungsabzweig 18 für überschüssige Probeanteile Q vorgesehen, dem in der Förderleitung 16 ein Ventil 48 nachgeschaltet ist.

PATENTANSPRÜCHE

1. Verfahren für die Darstellung von biologisch aktivierten in-
5 duktivitätsändernden, insbesondere ferromagnetischen bzw. superparamagnetischen, Partikeln,

dadurch gekennzeichnet,

10 dass monovalente primäre Antikörper mit induktivitätsändernden Partikeln im Überschuss gemischt werden, welche mit sekundären Antikörpern beschichtet sind, und anschließend mittels partieller Sedimentation aggregierte Partikel abgetrennt werden, die aus einem
15 monovalenten primären Antikörper und antikörper-beschichteten induktivitätsändernden Teilpartikeln bestehen.

2. Verfahren für die Darstellung von biologisch aktivierten in-
20 duktivitätsändernden, insbesondere ferromagnetischen bzw. superparamagnetischen, Partikeln, dadurch gekennzeichnet, dass Viren mit induktivitätsändernden Partikeln im Überschuss gemischt werden, welche mit gegen die Hüllproteine der Viren gerichteten Anti-
25 körpern beschichtet sind, und anschließend mittels partieller Sedimentation aggregierte Partikel abgetrennt werden, die aus einem Virus und antikörper-beschichteten induktivitätsändernden Teilpartikeln bestehen.

3. Verfahren für die Darstellung von biologisch aktivierten in-
30 duktivitätsändernden, insbesondere ferromagnetischen bzw. superparamagnetischen, Partikeln, dadurch gekennzeichnet, dass spacermolekül-gekoppelte Oligonukleotid-Gensonden mit induktivitätsändernden Parti-
35 keln im Überschuss gemischt werden, welche mit gegen die Spacermoleküle gerichteten Antikörpern beschichtet sind, und anschließend mittels partieller Sedimenta-

tion aggregierte Partikel abgetrennt werden, die aus einer Gensonde und antikörper-beschichteten induktivitätsändernden Teilpartikeln bestehen.

- 5 4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass biologische Partikel zum Nachweis bzw. zur Zählung immunologisch, phagologisch oder molekularbiologisch mit den aggregierten Partikeln verbunden werden, die als Marker beim anschließenden
10 Durchströmen einer Metallspule meßbare und zählbare Induktivitätsänderungen auslösen.
5. Verfahren nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, dass die Marker beim Durchströmen des Spaltes an einem
15 etwa C-förmig gebogenen Kern einer Metallspule messbare und zählbare Induktivitätsänderungen auslösen.
6. Verfahren nach Anspruch 4 oder 5, dadurch gekennzeichnet, dass induktivitätsändernde Partikel vor dem
20 Durchströmen der Metallspule mittels Elektromagnet in einer Kunststoffkapillare festgehalten und dort mit den in die Kapillare einströmenden biologischen Partikeln verbunden werden, während die sie enthaltende Probe aus der Kapillare herausgeführt wird.
- 25 7. Verfahren nach einem der Ansprüche 4 bis 6, dadurch gekennzeichnet, dass durch die Metallspule als Teil eines elektronischen Schwingkreises beim Durchströmen der induktivitätsändernden Partikel zählbare Änderungen der Eigenschwingfrequenz erzeugt werden.
- 30 8. Vorrichtung zum Nachweis und Zählen für suspendierte biologische Partikel in flüssigen Proben, insbesondere Vorrichtung zum Durchführen der Verfahren nach
35 wenigstens einem der vorausgehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass eine Förderleitung (16) für eine zu messende Probe als Messleitung (34) von einer Metallspule als Messspule (36, 36_a) umgeben und diese an

eine Einrichtung (46) zum Anregen der Schwingung und Messen von Resonanzereignissen angeschlossen ist.

- 5 9. Vorrichtung nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, dass die Metallspule (36_a) um einen etwa C-förmig gebogenen Kern (50) gelegt und dieser einen Spalt (52) aufweist, durch den die Messleitung (34) geführt ist.
- 10 10. Vorrichtung nach Anspruch 8 oder 9, dadurch gekennzeichnet, dass die Förderleitung (16) an eine Einrichtung mit Kapillaren (20), insbesondere Teflonkapillaren, angeschlossen ist sowie letztere einem Elektromagneten (22) zugeordnet sind.
- 15 11. Vorrichtung nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, dass die Kapillare/n (20) in einem von einem Polschuh (24) umgebenen Raum (30) angeordnet sind.
- 20 12. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 8 bis 11, dadurch gekennzeichnet, dass zwischen den Elektromagneten (22) und einem Ventil (48) der Förderleitung (16) eine Zweigleitung (18) für überschüssige Proben (Q) angeordnet ist.
- 25 13. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 8 bis 12, dadurch gekennzeichnet, dass der Einrichtung (46) zum Anregen der Schwingung und Messen von Resonanzereignissen zur Metallspule (36, 36_a) hin wenigstens ein Widerstand (42) sowie ein Kondensator (44) vorgeordnet sind.

14. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 8 bis 13, dadurch gekennzeichnet, dass die Messspule (36, 36_a) mit vorgeordneter Piezopumpe (32) und nachgeordnetem Widerstand (42) bzw. Kondensator (44) Teile einer mikro-systemtechnischen Einheit (40) sind.

ZUSAMMENFASSUNG

Bei einem Verfahren für die Darstellung von biologisch
5 aktivierten induktivitätsändernden -- insbesondere ferro-
magnetischen bzw. superparamagnetischen -- Partikeln werden
monovalente primäre Antikörper mit induktivitätsändernden
Partikeln im Überschuss gemischt, welche mit sekundären
Antikörpern beschichtet sind, und anschließend mittels
10 partieller Sedimentation aggregierte Partikel abgetrennt;
diese bestehen aus einem monovalenten primären Antikörper
und antikörper-beschichteten induktivitätsändernden
Teilpartikeln. Zudem werden bei einem weiteren Verfahren
Viren mit ferromagnetischen Partikeln im Überschuss
15 gemischt, welche mit gegen die Hüllproteine der Viren
gerichteten Antikörpern beschichtet sind, und anschließend
mittels partieller Sedimentation aggregierte Partikel
abgetrennt; diese bestehen aus einem Virus und antikörper-
beschichteten induktivitätsändernden Teilpartikeln.

20

Bei einer Vorrichtung zum Nachweis und Zählen für suspen-
dierte biologische Mikropartikel in flüssigen Proben ist
eine Förderleitung (16) für eine zu messende Probe als
Messleitung (34) von einer Metallspule als Messspule (36_a)
25 umgeben und diese an eine Einrichtung (46) zum Anregen der
Schwingung und Messen von Resonanzereignissen angeschlos-
sen; die Metallspule (36_a) ist um einen etwa C-förmig gebo-
genen Kern (50) gelegt und dieser weist einen Spalt (52)
auf, durch den die Messleitung (34) geführt ist.

30

Fig. 3



